

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SOFIA ISABEL RIBEIRO PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE METALOPROTEASES
DE MATRIZ EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES**

**CURITIBA
2008**

SOFIA ISABEL RIBEIRO PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE METALOPROTEASES DE
MATRIZ EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Patologia Básica como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Co-orientadora: MSc. Michele Dietrich

**CURITIBA
2008**

À Michele

AGRADECIMENTOS

Ao professor e colaborador Roberto Andreatini, por me apresentar ao mundo da ciência, pela paciência e compreensão ao longo de quase três anos, pelo apoio e incentivo tanto nos momentos de desânimo, quando os obstáculos pareciam intransponíveis, quanto nos momentos de alegria, em que todo o esforço era finalmente recompensado.

Ao meu orientador, prof. Sílvio M. Zanata, por me aceitar no seu laboratório e me dar uma oportunidade, por me desafiar a chegar cada vez mais longe e por me deslumbrar com as idéias de uma mente brilhante.

À minha co-orientadora Michele, pela amizade, por tudo que me ensinou, por acreditar e confiar em mim, pelo carinho, por estar sempre disponível para qualquer coisa que eu precisasse, em qualquer momento, por me adotar como aprendiz (acho que somos uma boa dupla) e por tomar conta de mim como uma irmã (super-protetora).

Aos amigos e colegas do Laboratório de Neurobiologia que contribuíram para este trabalho direta ou indiretamente, em especial Michele, Márcia, Mari, Fabíola, Vivi, Katya, Beth, Bea e Luiz, mas também a todos os outros, por serem bons companheiros de trabalho.

À professora Larissa pela ajuda, incentivo e valiosas sugestões.

Aos alunos do laboratório de matriz extracelular, pela ajuda, sugestões e empréstimos.

À Julia e à Jéssica, pela companhia e apoio ao longo de todo o tempo, pelos conselhos e paciência, mas principalmente pela amizade sincera.

Ao Denilson, pelo amor, carinho e compreensão incomparáveis.

Ao meu pai, por me ensinar a sempre querer dar o melhor de mim, em qualquer coisa que eu faça, e por me mostrar esse mundo apaixonante da biologia.

À minha família, especialmente aos meus irmãos Ricardo, Miguel, Rui e Beatriz, pelo carinho, força e muitos bons momentos.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa

RESUMO

A matriz extracelular (MEC) é constituída por uma rede complexa de macromoléculas, incluindo laminina, fibronectina, vitronectina, entactina, tenascina, agrecan, vários tipos de colágenos e proteoglicanos. Influencia processos celulares básicos como proliferação, sobrevivência, diferenciação, migração e adesão e atua como um reservatório para uma variedade de moléculas bioativas, citocinas e fatores de crescimento que direcionam o comportamento celular. A disposição das macromoléculas na matriz é de crucial importância e a sua proteólise é um dos principais fatores que levam ao remodelamento da MEC. É neste contexto em que se destacam as metaloproteases de matriz (MMP), uma família de enzimas com mais de 25 membros identificados até hoje. As MMPs são responsáveis pela remodelação da matriz extracelular em vários processos fisiológicos e patológicos como ovulação, implantação do blastocisto, crescimento ósseo, cicatrização, angiogênese, invasão de tumores, metástase, arteriosclerose, artrite reumatóide, doença periodontal, esclerose múltipla e doença de Alzheimer. A expressão de diversos membros da família das MMPs pode ser detectada no sistema nervoso central em todos os tipos celulares, desde neurônios até astrócitos, microglia e oligodendrócitos. Foi demonstrado que a modelação da arquitetura da matriz extracelular intrasináptica por MMPs é capaz de afetar eventos como a aprendizagem, memória e plasticidade sináptica, desencadeados pelo neurotransmissor glutamato, no hipocampo. Por este motivo, foi investigado o efeito da droga anti-glutamatérgica lamotrigina na atividade gelatinolítica de MMPs. Conhecendo a importância da matriz extracelular e das MMPs nos processos de migração, adesão e desenvolvimento neural, resolveu-se investigar também o possível envolvimento de PrPc, sialoglicoproteína de membrana, altamente expressa no sistema nervoso central que pode atuar como molécula de adesão, na atividade gelatinolítica de MMPs. Para isso foi necessário padronizar um ensaio baseado em microplacas de poliestireno para determinação da atividade gelatinolítica de MMP, que emprega gelatina biotinilada. O princípio consiste na capacidade da estreptavidina capturar a biotina ligada aos fragmentos de gelatina digeridos por MMPs, de tal forma que quanto maior a concentração de enzima na amostra, maior será a digestão do substrato e consequentemente menor a absorbância. Foram escolhidas quatro linhagens celulares: uma de fibroblastos imortalizados e três tumorais. Da linhagem imortalizada de fibroblasto murino (MEF), foi utilizada uma cepa selvagem (WT) e outra nocaute (KO) para a proteína príon celular PrPc. Das três linhagens tumorais, uma é proveniente de um adenocarcinoma cervical humano (HeLa), e as duas restantes são provenientes de tecido do sistema nervoso: uma de glioblastoma multiforme humano (T98G) e outra de neuroblastoma murino (N2a). Através do presente trabalho podemos concluir que todas as linhagens celulares aqui analisadas provavelmente secretam uma mistura complexa de várias proteases capazes de digerir colágeno tipo I desnaturado. Além disso, verificamos que, nas condições e métodos aqui utilizados, essa atividade proteolítica é aumentada na ausência da proteína príon celular na superfície da célula, mas não é alterada pela presença da droga antiglutamatérgica lamotrigina no meio de cultivo. No entanto, mais estudos são necessários para o isolamento e caracterização das enzimas aqui detectadas.

ABSTRACT

The extracellular matrix (ECM) is composed of a complex network of macromolecules, including laminin, fibronectin, vitronectin, entactin, tenascin, aggrecan and several types of collagens and proteoglycans. It influences basic cellular processes such as proliferation, survival, differentiation, migration and adhesion and acts as a reservoir for a variety of bioactive molecules, cytokines and growth factors that lead cell behavior. The supramolecular presentation of molecules within the ECM is of critical importance and its proteolysis is one of the major factors leading to changes in the ECM. In this context we highlight the matrix metalloproteinases (MMP), a family of enzymes with more than 25 members identified to date. The MMPs are responsible for remodeling the extracellular matrix in several physiological and pathological processes such as ovulation, blastocyst implantation, bone growth, wound healing, angiogenesis, tumor invasion, metastasis, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, periodontal disease, multiple sclerosis and Alzheimer's disease. The expression of many MMP family members can be detected in the central nervous system, in all cells types, from neurons to astrocytes, including microglia and oligodendrocytes. It has been shown that the modeling of the intrasynaptic extracellular matrix architecture by MMPs is able to affect events like learning, memory and synaptic plasticity, triggered by the neurotransmitter glutamate, in the hippocampus. For this reason the effect of the antiepileptic drug lamotrigine on the MMP gelatinolytic activity was investigated. Since the extracellular matrix's and MMP's contribution in processes such as migration, adhesion and neural development we decided to investigate the possible involvement of the membrane sialoglycoprotein PrPc, an adhesion molecule highly expressed in the central nervous system in the MMP gelatinolytic activity. In order to do that it was necessary to set up a plastic microtiter plate assay to determine the MMP gelatinolytic activity, using biotinylated gelatin. The principle is based on the streptavidin ability to capture biotin-labeled MMP digested gelatin fragments, in such way that the greater the sample enzyme concentration, the greater the extent of substrate digestion and therefore, the lower the absorbance. Four cell lines were chosen: one of immortal fibroblast and 3 tumoral. From the murine embryonic fibroblast were used a wild type and PrPc knockout strains. From the 3 tumoral cell lines, one is derived from human cervix adenocarcinoma (HeLa) and the remaining two are derived from nervous system tissue: one of multiform human glioblastoma (T98G) and the other of murine neuroblastoma (N2a). In the present work we show that all the cell lines analyzed here probably secrete a complex mixture of several proteinases able to digest denatured type I collagen. Besides it, we verified that, in the conditions and methods here employed, the proteolytic activity is increased in the absence of the cellular prion protein on the cell surface, however no changing in the proteolytic activity was observed by the presence of the antiepileptic drug lamotrigine in the culture medium. However, more studies are necessary to isolate and further characterize the enzymes here detected.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura tridimensional básica das MMPs obtida por cristalografia	12
Figura 2 - Estrutura básica dos domínios das MMPs.....	13
Quadro 1 - Principais MMPs e seus substratos típicos de matriz e outros substratos não-tradicionais.....	15
Figura 3 - Biotinilação de proteínas.....	18
Figura 4 - Etapa de Biotinilação.....	21
Figura 5 - Etapa de digestão da gelatina biotinilada por metaloproteases.....	23
Figura 6 - Ensaio para determinação da atividade gelatinolítica de MMPs usando GB.....	23
Gráfico 1 - Determinação da concentração ótima de gelatina biotinilada.....	25
Gráfico 2 - Influência do tempo de condicionamento na atividade gelatinolítica de MMPs secretadas pela linhagem HeLa.....	26
Gráfico 3 - Influência do tempo de incubação com GB em três linhagens celulares..	27
Gráfico 4 - Efeito do PMSF e desnaturação protéica causada por fervura na atividade gelatinolítica de MMPs em N2a.....	28
Figura 7 - Efeito da Fenantrolina sobre a atividade gelatinolítica de proteases secretadas por HeLa, T98G e N2a detectada por zimografia.....	29
Gráfico 5 - Digestão de GB por tripsina, na presença ou ausência de inibidores de proteases.....	30
Gráfico 6 - Efeito da Lamotrigina da atividade gelatinolítica de MMPs secretadas por N2a.....	31
Gráfico 7 - Efeito da presença de PrPc sobre a atividade gelatinolítica de MMPs secretadas por MEF selvagens (WT) e nocaute (KO).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM	–	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
APMA	–	4-aminofenilmercúrio
ATCC	–	<i>American Type Culture Collection</i>
EDTA	–	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	–	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	–	excesso molar
E-HRP	–	Estreptavidina conjugada à enzima peroxidase
Fe	–	1,10 Fenantrolina
GB	–	gelatina biotinilada
GPI	–	glicosilfosfatidilinositol
HeLa	–	Linhagem de adenocarcinoma cervical humano Henrietta Lacks
kDa	–	quilodalton
KO	–	nocaute
MEC	–	Matriz Extracelular
MEF	–	Linhagem de fibroblasto embrionário murino
MEM	–	<i>Minimum Essential Medium</i>
MMP	–	Metaloprotease de Matriz
N2a	–	Linhagem de neuroblastoma murino Neuro-2a
NEM	–	N-Etil Maleimida
NMDA	–	N-metil-D-aspartato
PBS	–	solução salina tamponada com fosfato
PBST	–	solução salina tamponada com fosfato acrescida de Tween 20
PMSF	–	Fenilmetilsulfonilflúor
PrPc	–	Proteína príon celular
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	–	<i>SDS- polycrylamide gel electrophoresis</i>
SNC	–	sistema nervoso central
T98G	–	Linhagem de glioblastoma multiforme humano
TBST	–	solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 20
TIMP	–	Inibidor Tecidual de Metaloproteases de Matriz
Tris	–	Tris (hidroximetil) amino metano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS MMPS.....	11
1.2 INFLUÊNCIA DE MMPS NA PLASTICIDADE NEURONAL E SINÁPTICA	16
1.3 PROTEÍNA PRÍON CELULAR.....	17
1.4 SISTEMA BIOTINA - ESTREPTAVIDINA.....	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 CULTURA CELULAR.....	21
3.1.1 Cultivo das células para recuperação do meio condicionado.....	21
3.1.2 Tratamento das células com lamotrigina	21
3.2 BIOTINILAÇÃO DA GELATINA	22
3.3 ENSAIO BASEADO EM MICROPLACAS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMP UTILIZANDO GELATINA BIOTINILADA.....	23
3.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMPS POR ZIMOGRÁFIA.....	24
3.5 ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MMPS POR IMMUNOBLOTTING.....	24
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 BIOTINILAÇÃO DA GELATINA	26
4.2 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE CONDICIONAMENTO DO SOBRENADANTE DE CULTURA.....	26
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DA ENZIMA COM O SUBSTRATO	28
4.4 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES DE PROTEASES.....	29
4.5 DIGESTÃO DE GELATINA POR OUTRAS PROTEASES	31
4.6 EFEITO DA LAMOTRIGINA NA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMPS..	33
4.7 EFEITO DA PROTEÍNA PRÍON CELULAR NA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMPS.....	34
4.8 ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MMPS POR IMMUNOBLOTTING.....	35
4.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
5. CONCLUSÃO.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (MEC) é constituída por uma rede complexa de macromoléculas, incluindo laminina, fibronectina, vitronectina, entactina, tenascina, agrecan, vários tipos de colágenos e proteoglicanos. É responsável por providenciar textura, força e integridade aos tecidos, cujas funções dependem não só de uma grande diversidade de tipos celulares, mas ainda da constituição da matriz extracelular (VU, 2001). Também desempenha um papel instrutivo no direcionamento do desenvolvimento e morfogênese de embriões de vertebrados e influencia processos celulares básicos como proliferação, sobrevivência, diferenciação, migração e adesão (MATRISIAN, 1992; LETOURNEAU, 1994). A MEC também atua como um reservatório para uma variedade de moléculas bioativas, citocinas e fatores de crescimento que direcionam o comportamento celular (VU, 2001). As células apresentam na sua superfície receptores para as diferentes moléculas de matriz, o que lhes permite perceber o microambiente que as rodeia e responder a estímulos daí provenientes. Tem se tornado evidente que as células utilizam diversas estratégias para assegurar um controle preciso do ambiente extracelular, uma vez que um equilíbrio preciso é necessário para o funcionamento normal do organismo (revisado em STERNLICHT e WERB, 2001). Consequentemente, a disposição das macromoléculas na matriz é de crucial importância e a sua proteólise é um dos principais fatores que levam a alterações na MEC (MOTT, 2004).

É neste contexto que se destacam as metaloproteases de matriz (MMP), uma família de enzimas com mais de 25 membros identificados até ao momento, responsáveis pela remodelação da matriz extracelular em vários processos fisiológicos e patológicos (YONG *et al.*, 1998). Estas enzimas são caracterizadas pela presença de um átomo de zinco no domínio catalítico, necessário para a proteólise dos componentes da MEC. São proteases sintetizadas na forma de zimogênio e ativadas através da clivagem do pró-domínio. O processo dinâmico de síntese e degradação da matriz é regulado com precisão: após a ativação, as MMPs estão sujeitas a inibição por ligação não covalente com inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs) (DZWONEK *et al.*, 2004). Com relação ao papel fisiológico desempenhado pelas MMPs pode-se destacar a sua importância na ovulação,

implantação do blastocisto, crescimento ósseo, cicatrização e angiogênese. Participam também de vários processos patológicos como invasão de tumores, metástase, arteriosclerose, artrite reumatóide, doença periodontal, esclerose múltipla e doença de Alzheimer (YONG *et al.*, 1998).

A expressão de diversos membros da família das MMPs pode ser detectada no sistema nervoso central (SNC) em todos os tipos celulares, desde neurônios até astrócitos, microglia e oligodendrócitos. No entanto, a sua função durante o desenvolvimento neural e em doenças neurológicas está apenas começando a ser desvendada (YONG *et al.*, 1998).

Foi demonstrado que a modelação da arquitetura da matriz extracelular intrasináptica por MMPs é capaz de afetar eventos como a aprendizagem, memória e plasticidade sináptica, desencadeados pelo neurotransmissor glutamato. (MEIGHAN *et al.*, 2006, WRIGHT *et al.*, 2003, CHAILLAN *et al.*, 2006, NAGY *et al.*, 2007). Por este motivo foi investigado o efeito da droga anti-glutamatérgica lamotrigina na atividade gelatinolítica de MMPs.

A proteína príon celular (PrPc) é uma sialoglicoproteína de membrana, (PRUSINER, 1998) altamente expressa no sistema nervoso central que pode atuar como molécula de adesão (GRANER *et al.*, 2002; MANGÉ *et al.*, 2002). Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, as células precursoras de neurônios migram para seus destinos finais e os axônios fazem conexões com alvos específicos a fim de estabelecer uma correta rede nervosa (KANDEL *et al.*, 2000). Entre uma série de proteínas envolvidas neste fenômeno, moléculas de adesão possuem um papel central na interação célula-matriz e célula-célula. Conhecendo a importância da matriz extracelular e das MMPs nos processos de migração, adesão e desenvolvimento neural, resolveu-se investigar também o possível envolvimento de PrPc na regulação da atividade gelatinolítica de MMPs.

1.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS MMPs

Em geral, a estrutura das MMPs consiste de um peptídeo sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico, uma região dobradiça (*hinge*) e um domínio semelhante a hemopexina (figura 1).

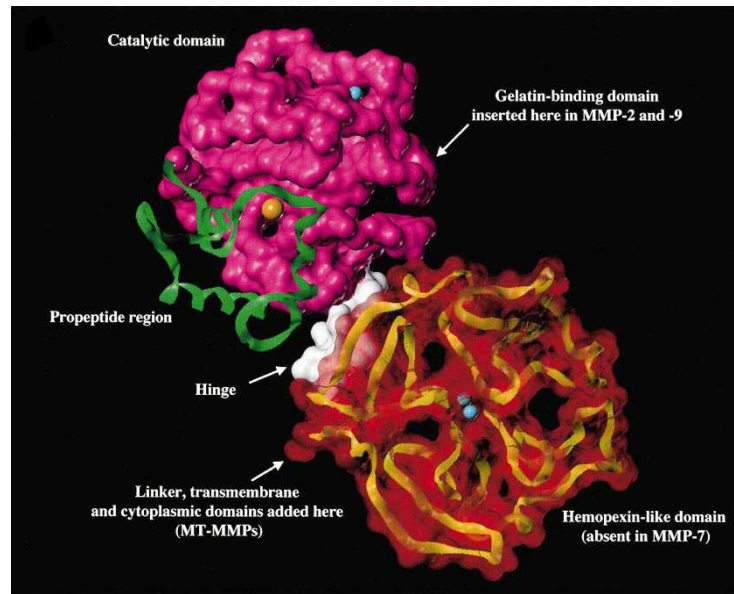


FIGURA 1 - Estrutura tridimensional básica das MMPs obtida por cristalografia O domínio catalítico está representado em rosa, com o zinco catalítico representado como uma esfera em laranja e os íons cálcio como esferas azuis. O pró-domínio está em verde, a região dobradiça (*hinge*) em branco, o domínio hemopexina em amarelo. FONTE:adaptado de MASSOVA *et. al.* (1998).

O peptídeo sinal consiste em uma sequência hidrofóbica de 18-30 resíduos, que sinaliza a rota de secreção para o meio extracelular. O pró-domínio é constituído de aproximadamente 88 aminoácidos e contém um resíduo de cisteína na posição 73 na sequência conservada PRCGVDP, posicionada diretamente sobre o zinco do sítio ativo. Este é chamado *cysteine switch*, pois quando este resíduo é deslocado do sítio ativo dá-se a ativação da enzima. O domínio catalítico compreende entre 160 a 170 resíduos, com o sítio ativo onde o zinco se liga às histidinas da sequência HELGHXXGXXH. Nas MMP-2 e 9, o domínio catalítico conta ainda com 3 repetições *em tandem* de mais ou menos 58 resíduos que constituem o domínio semelhante a fibronectina tipo II, responsável pela ligação destas enzimas aos componentes de matriz colágeno I, IV e laminina. A MMP-9 apresenta ainda uma inserção colágeno tipo V de 54 resíduos, rica em prolina, o que faz dela o maior membro desta família. Em seguida, tem-se a região de ligação, que pode variar entre 2 a 72 aminoácidos, situada entre o final do domínio catalítico e a primeira cisteína do domínio semelhante a hemopexina. Este último é responsável pela ligação a alguns componentes da matriz, assim como pela ligação de TIMPs (WOESSNER *et. al.*, 2000).

Em geral, as MMPs clivam uma ligação peptídica antes de um resíduo com cadeia lateral hidrofóbica, como leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina ou tirosina. Estes resíduos encaixam dentro de uma “bolsa” à direita do sítio ativo, cujo tamanho varia entre as MMPs, o que determina a especificidade de substrato (VISSE *et. al.*, 2003).

As MMPs podem ser ativadas *in vivo* por outras proteases ou óxido nítrico, e *in vitro* por agentes químicos como acetato de 4-aminofenilmercúrio (APMA), HgCl_2 , N-etilmaleimida, glutatona oxidada, dodecil sulfato de sódio, agentes caotrópicos e espécies reativas de oxigênio. Estes agentes possivelmente atuam através do distúrbio da interação zinco-cisteína do *cysteine switch* (VISSE *et. al.*, 2003).

Para controlar a atividade das MMPs, foram identificados em vertebrados 4 inibidores endógenos, os TIMPs-1, 2, 3 e 4, cuja expressão é regulada durante o desenvolvimento e remodelação do tecido. Com 21 a 29 kDa, os TIMPs têm dois domínios: um N e um C-terminal, com aproximadamente 125 e 65 aminoácidos, respectivamente, cada um com 3 pontes dissulfeto conservadas (WOESSNER *et. al.*, 2000). Além de inibir MMPs, existem cada vez mais evidências de que os TIMPs também podem ter outras funções biológicas. Como inibidor endógeno de proteases podemos acrescentar a α -macroglobulina, uma glicoproteína plasmática de 725 kDa. (NAGASE *et. al.*, 2006).

De acordo com a especificidade de substrato, similaridade de sequência e organização de domínios, as MMPs podem ser divididas em seis grupos: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs de membrana e outras MMPs (figura 2).

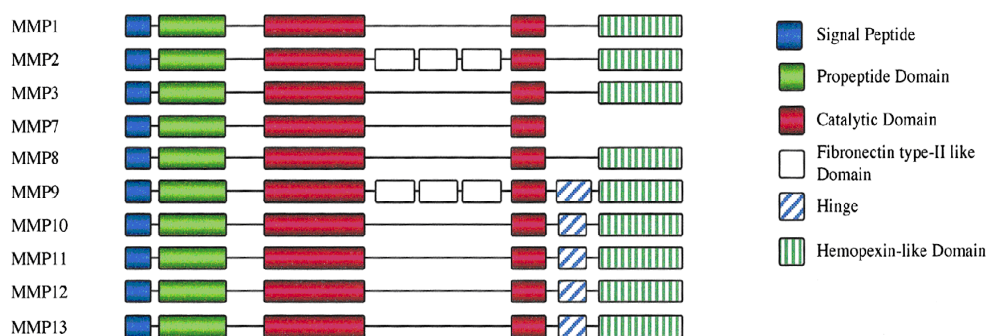


FIGURA 2 - Estrutura básica dos domínios das MMPs Em azul está representado o peptídeo sinal, em verde o pró-domínio, em vermelho o domínio catalítico, em branco o domínio semelhante a fibronectina tipo II, em riscas azuis diagonais, a região dobradiça (*hinge*) e em riscas verdes verticais o domínio semelhante a hemopexina. FONTE: adaptado de MASSOVA *et. al.* (1998).

As MMP-1, 8, 13 e 18 pertencem ao grupo das collagenases, o grupo caracterizado pela capacidade de clivar colágeno intersticial tipo I, II, e III em um local específico, a $\frac{3}{4}$ da extremidade N-terminal. As MMP-2 e 9 são codificadas por genes localizados no cromossomo humano 16 e são chamadas gelatinases, uma vez que digerem colágeno desnaturado (MURPHY & CRABE, 1995). As estromelisinases 1 e 2, MMP-3 e 10 respectivamente, digerem vários componentes da matriz extracelular e a MMP-3 ainda é responsável pela ativação de várias pró-MMPs. As matrilisinas (MMP-7 e MMP-26) são caracterizadas pela ausência do domínio semelhante a hemopexina, e são capazes de processar moléculas de superfície de membrana, além de digerir os componentes da MEC. Existem 6 MMPs de membrana, freqüentemente associadas à ativação de pró-MMPs: 4 proteínas transmembrânicas tipo I (MMP-14, 15, 16 e 24) e 2 proteínas ancoradas por GPI (MMP-17 e 25). Por não se classificarem nas categorias anteriores, existem 7 enzimas (MMP-12, 19, 20, 22, 23 e 28) que são agrupadas como “outras MMPs” (NAGASE *et. al.*, 2006).

Além de seu já conhecido papel na degradação dos componentes da matriz extracelular, está claro que as MMPs também são responsáveis pela clivagem e liberação de fragmentos bioativos, citocinas e fatores de crescimento aprisionados na MEC, como o fator de necrose tumoral $\text{TNF}\alpha$, a interleucina $\text{IL } 1\text{-}\beta$ e o fator de crescimento transformante $\text{TGF}\beta$ (McCAWLEY e MATRISIAN, 2001, MOTT e WERB, 2004). Os substratos das principais MMPs estão resumidos no quadro 1.

MMP	Grupo	Massa Molecular L/A	Substratos (MEC)	Outros Substratos
1	Colagenase	55000/45000	Colágeno I/II/III/VII/X, Gelatina, Entactina, Agrecan, Tenascina	Pro-MMP 1,2 Pro-TNF α
2	Gelatinase	72000/66000	Gelatina, Elastina, Fibronectina, Colágeno I/IV/V/VII/X/XI, Laminina, Agrecan, Vitronectina	Pro MMP 1,2,13 Pro-TNF α Pro-TGF β 2 Pro-IL 1- β
3	Estromelisina	57000/45000	Proteoglicanos, Laminina, Fibronectina, Gelatina, Colágeno III/IV/V/IX/X/XI, Fibrina/Fibrinogênio, Entactina, Tenascina, Vitronectina	Plasminogênio Pro-MMP 1,3,7,8,9,13 Pro-TNF α , Pro-IL 1- β Perlecan
7	Matrilisina	28000/19000	Proteoglicanos, Laminina, Fibronectina, Gelatina, Colágeno III/IV/V/IX/X/XI, Fibrina/Fibrinogênio, Entactina, Tenascina, Vitronectina	Pro-MMP 2,7, Pro-TNF α Plasminogênio
8	Colagenase	75000/58000	Colágeno I/II/III/VII/X, Gelatina, Entactina, Agrecan, Tenascina	Pro-MMP 8
9	Gelatinase	92000/86000	Gelatina, Elastina, Fibronectina, Colágeno I/IV/V/VII/X/XI, Laminina, Agrecan, Vitronectina	Pro-TNF α Plasminogênio Pro-IL 1- β Pro-TGF β 2
10	Estromelisina	57000/44000	Proteoglicanos, Laminina, Fibronectina, Gelatina, Colágeno III/IV/V/IX/X/XI, Fibrina/Fibrinogênio, Entactina, Tenascina, Vitronectina	Pro-MMP 1,8,10
13	Colagenase	60000/48000	Colágeno I/II/III/VII/X, Gelatina, Entactina, Agrecan, Tenascina	Pro-MMP 9,13
14	Membrana	66000/56000	Gelatina, Fibronectina, Vitronectina, Colágeno, Agrecan	Pro-MMP 2,13
16	Membrana	64000/52000	Gelatina, Fibronectina, Vitronectina, Colágeno, Agrecan	Pro-MMP 2
17	Membrana	57000/53000	Gelatina	Pro-MMP 2
26	Matrilisina	28000/19000	Gelatina, Colágeno IV, Fibronectina, Fibrinogênio	Pro-MMP 9

QUADRO 1 - Principais MMPs e seus substratos típicos de matriz e outros substratos não-tradicionais Após o nome e grupo de cada enzima está a massa molecular em Dalton das formas latente (L) e ativa (A), em seguida as proteínas de Matriz Extracelular que são alvo de clivagem proteolítica e por fim as outras moléculas que também podem ser substratos para MMPs. Vale ressaltar que a gelatina é alvo de clivagem por quase todos os membros desta família. FONTE: adaptado de McCawley e Matrisian (2001).

1.2 INFLUÊNCIA DE MMPS NA PLASTICIDADE NEURONAL E SINÁPTICA

Foi demonstrado que a atividade de MMP-9 é necessária para extensão e mielinização dos processos de oligodendrócitos (OH *et al.*, 1999) e para o remodelamento dendrítico no hipocampo adulto (SZKLARCZYK *et al.*, 2002). A plasticidade sináptica é frequentemente relacionada com modelos comportamentais e celulares de aprendizado e memória (DUMAN, 2002). Nesta linha de pesquisa, foi evidenciado que a modulação da estrutura da matriz extracelular pelas MMP-3 e MMP-9 afeta a plasticidade sináptica e aprendizagem dependente de hipocampo, de forma que a inibição das mesmas inviabiliza a memória espacial de ratos no labirinto aquático de Morris (MEIGHAN *et al.*, 2006). Em outro estudo foi postulado que o prejuízo induzido por etanol na memória espacial em ratos pode ser em parte devido a uma diminuição da atividade das MMPs no cérebro (WRIGHT *et al.*, 2003). Chaillan e colaboradores (2006) demonstraram que o inibidor tecidual de MMPs TIMP-1 está envolvido na aprendizagem e memória em camundongos, sugerindo que a atividade das MMPs modula a plasticidade neuronal que normalmente acompanha estes processos, de tal forma que atividade proteolítica alterada pode prejudicar as funções cognitivas. Nagy e colaboradores (2007) observaram que o treinamento de ratos no modelo de esquila inibitória induz um período de atividade proteolítica mediada por MMPs, crítico para as modificações sinápticas duradouras nas quais se baseia a consolidação da memória de longo-prazo.

Estudos recentes comprovam o envolvimento do neurotransmissor excitatório glutamato em processos como o desenvolvimento neural, plasticidade sináptica, aprendizado, memória, ansiedade e depressão (CAROBREZ, 2003). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, AMPA e Kainato) são canais iônicos que promovem o influxo e efluxo de sódio, potássio e cálcio da célula, o que altera o potencial de membrana e resulta na ativação direta de vias de sinalização intracelular (DU *et al.* 2006).

A ativação do receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA) sinaliza para ativação múltipla de genes e plasticidade sináptica a longo prazo. No entanto, superestimulação destes receptores resulta no fenômeno conhecido como excitotoxicidade, devido ao influxo excessivo de cálcio (KEMP e MCKERNAN, 2002). A administração do agonista NMDA é responsável pela diminuição da proliferação

de células no hipocampo adulto, enquanto que esta se encontra aumentada após administração de antagonistas de receptor NMDA (MCKOWIAK *et al.*, 2005).

Uma ferramenta útil para o estudo de receptores de glutamato de tipo NMDA é a droga lamotrigina. A lamotrigina é um anticonvulsivante de amplo espectro, pertencente à classe dos inibidores de canais de sódio voltagem dependentes, que conseqüentemente inibem a liberação de glutamato em neurônios glutamatérgicos (SPORN e SACHS, 1997). A lamotrigina demonstrou propriedades neuroprotetoras em vários modelos de excitotoxicidade ou isquemia, *in vivo* (KETTER e MANJI, 2003, DI DANIEL *et al.*, 2005) e propriedades antidepressivas, relacionadas aos sistemas glutamatérgico, monoaminérgico e óxido nítrico (PAUL e SKOLNICK, 2003).

A lamotrigina foi então utilizada para testar o envolvimento de receptores glutamatérgicos NMDA na modulação da atividade de MMPs secretadas por linhagens celulares de neuro e glioblastoma.

1.3 PROTEÍNA PRÍON CELULAR

A proteína príon celular é uma sialoglicoproteína localizada na superfície da célula via âncora de glicosilfosfatidil-inositol (GPI) expressa em muitos tecidos, mas em particular no sistema nervoso central (PRUSINER, 1997).

Pela associação com a proteína ST11 (*Stress Inducible Protein-1*), PrPc promove a ativação de mecanismos neuroprotetores (via cAMP/PKA) em neurônios de retina que foram induzidos a apoptose por inibidores de síntese protéica (ZANATA *et al.*, 2002). Recentemente foi mostrado que a interação destas duas proteínas (PrPc/ST11) promove a neuritogênese pela ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e neuroproteção pela ativação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) em neurônios hipocâmpais (LOPES *et al.*, 2005).

O potencial adesivo de PrPc foi demonstrado em células de neuroblastoma (N2a) que super-expressam PrPc. Essas células apresentam uma alta taxa de agregação quando comparadas com células normais, sendo que esta é inibida por anticorpos anti-PrPc. Esses resultados mostram que a agregação é em grande parte mediada pela ligação transcelular de PrPc à alguma molécula receptora ainda

desconhecida (MANGÈ *et al.*, 2002). Além disso, foi descrito que PrPc é um receptor para laminina e esta interação é importante para a adesão neuronal e para a extensão e manutenção de neuritos em culturas de células da linhagem PC12 e neurônio hipocampais (GRANER *et al.*, 2000).

Com relação à interação com proteínas de matriz, além da laminina, PrPc também liga vitronectina, mas não liga fibronectina e nem colágeno tipo IV (HAJJ *et al.*, 2007).

Para investigar o possível envolvimento da proteína príon celular na regulação da atividade gelatinolítica mediada por MMPs foi utilizada uma linhagem selvagem e outra nocaute para PrPc.

1.4 SISTEMA BIOTINA - ESTREPTAVIDINA

A estreptavidina é uma proteína de aproximadamente 60 kDa isolada de *Streptomyces avidinii* composta por 4 subunidades, com ponto isoelétrico entre 5-6 e com alta afinidade por biotina, sendo a interação entre as duas moléculas uma das mais fortes conhecidas, com constante de dissociação da ordem de 10^{-15} M. A biotina, ou vitamina H, é uma molécula naturalmente presente em pequenas quantidades nas células, como fator de crescimento, cofator e transportador de CO₂. Pode também ligar-se diretamente a outras proteínas através da cadeia lateral de ácido valérico (HERMANSON, 1996) através da reação mostrada na figura 3. Estas propriedades das duas moléculas são a base da técnica empregada no método desenvolvido por Ratnikov e colaboradores (2000), que tentamos reproduzir neste trabalho, adaptando-o às condições locais de experimentação.

Este ensaio provê um sistema sensível, prático e eficiente para avaliação de atividade gelatinolítica em soro, lisados de células, sobrenadantes e outras amostras. É mais rápido do que o tradicional zimograma e permite triagem em larga escala de bibliotecas químicas de inibidores de gelatinases. É capaz de detectar atividade de MMP-2 em concentrações tão baixas quanto 0,16 ng/ml (RATNIKOV *et al.*, 2000). O princípio consiste na capacidade da estreptavidina capturar a biotina ligada aos fragmentos de gelatina digeridos por MMPs, de tal forma que é possível determinar quantitativamente a concentração de enzima presente em uma amostra,

frente a uma curva padrão estabelecida através do uso de MMP 2 e MMP 9 purificadas. Quanto maior a concentração de enzima na amostra, maior será a digestão do substrato e conseqüentemente menor a absorbância, pois menos fragmentos irão conter pelo menos as duas biotinas necessárias para detecção pelo ensaio: uma que se liga a estreptavidina imobilizada em placa de 96 posições (captura), e outra que se liga à estreptavidina conjugada à enzima peroxidase (E-HRP; revelação/detecção), que quando em contato com a solução de revelação produzirá um produto colorido.

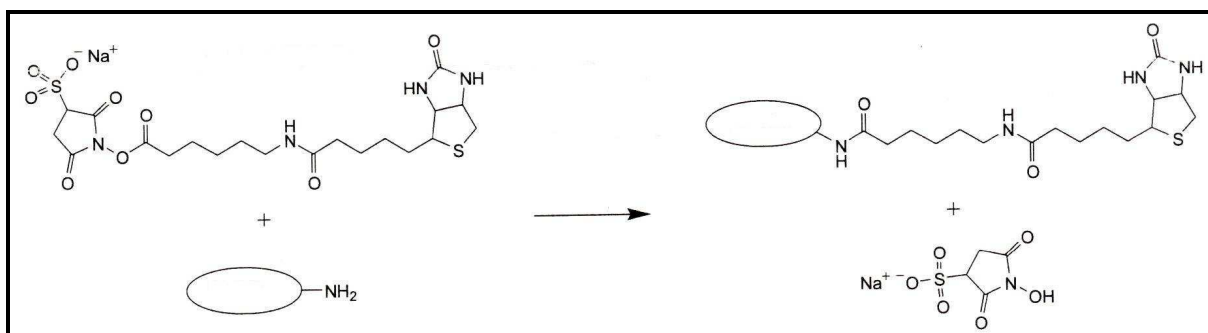


FIGURA 3 - Biotinilação de proteínas A molécula quimicamente modificada de biotina EZ-Link-Sulfo-NHS reage com agrupamentos amino da cadeia lateral de aminoácidos como a lisina, presente na proteína, aqui representada por uma elipse. (Nota: uma proteína pode ligar várias biotinas; representação fora de escala). FONTE: Catálogo Pierce (2008).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade gelatinolítica de metaloproteases de matriz secretadas por diferentes linhagens celulares, frente a diferentes estímulos;

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e padronizar um método eficaz de detecção da atividade gelatinolítica de metaloproteases de matriz utilizando um sistema de microplacas de poliestireno e gelatina biotinilada;
- Comparar a atividade gelatinolítica e o padrão de expressão de metaloproteases secretadas por diferentes linhagens celulares;
- Avaliar o efeito da droga antilutamatérgica Lamotrigina sobre a atividade gelatinolítica de MMPs secretadas pela linhagem de neuroblastoma murino (N2a) e de glioblastoma humano (T98G);
- Comparar a atividade gelatinolítica de MMPs expressas por fibroblasto imortalizado murino (MEF) selvagem e nocaute para a proteína príon celular (PrPc);

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA CELULAR

Todas as células utilizadas neste trabalho foram cultivadas de acordo com as indicações especificadas pela American Type Culture Collection (ATCC).

Foram escolhidas quatro linhagens celulares: uma de fibroblastos imortalizados e três tumorais. Da linhagem de fibroblastos imortalizados murinos (MEF), foi utilizada uma cepa selvagem (WT) e outra nocaute (KO) para a proteína príon celular PrP^c. Das 3 linhagens tumorais, uma é proveniente de um adenocarcinoma cervical humano (HeLa), sendo de fácil cultivo e crescimento rápido e portanto ideal para padronização das condições experimentais. As duas restantes são provenientes do sistema nervoso central: uma de glioblastoma multiforme humano (T98G) e outra de neuroblastoma murino (N2a).

3.1.1 Cultivo das células para recuperação do meio condicionado

As células em aproximadamente 90% de confluência foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS: 1.7 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 9.1 mM Na₂HPO₄, pH=7,4) /EDTA, seguido de tratamento com 0,2% de tripsina. Em seguida foram replaqueadas em meio condicionado (sem soro fetal bovino) na densidade de 1×10^6 células em uma placa de petri P60 (TPP). As células foram condicionadas e o meio de cultivo coletado e processado de acordo com os procedimentos indicados em cada experimento. O mesmo procedimento foi realizado nas células submetidas a um tratamento com a droga lamotrigina.

Para utilização em *immunoblotting* e em zimografia, as MMPs do sobrenadante do meio de cultivo foram concentradas 20x no ultraconcentrador Amicon ultra com filtro de poros que permitem a passagem de moléculas até 10 kDa (Milipore, USA) por centrifugação a 4000 G, por 15 minutos a 4°C.

3.1.2 Tratamento das células com lamotrigina

A lamotrigina (Cristália, Brasil), foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionada ao meio de condicionamento das linhagens T98G e N2a, na concentração final de 10, 50 ou 100 µM (DI DANIEL *et al.*, 2005).

3.2 BIOTINILAÇÃO DA GELATINA

A biotinilação da gelatina (Difco) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante de biotina (Pierce). Foi preparada uma solução 10 mg/ml de gelatina e a quantidade de biotina (EZ-Link Sulfo NHS-Biotin, Pierce) necessária para biotinilar 10mg de gelatina foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{ml proteína} \times (\text{massa de proteína em mg/ ml proteína}) \times (\text{mmol proteína/ massa de proteína em mg}) \times (\text{EM mmol biotina/mmol proteína}) = \text{mmol biotina}$$

onde:

EM = excesso molar desejado de biotina em relação à proteína

Foram testados dois valores de EM: 20 e 30. A reação foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente (figura 4) e a biotina excedente que não se ligou foi separada por gel filtração em coluna com Sephadex G10 Medium (Pharmacia Biotech). A concentração protéica da amostra foi determinada através do método do ácido bicíntrico (Pierce).

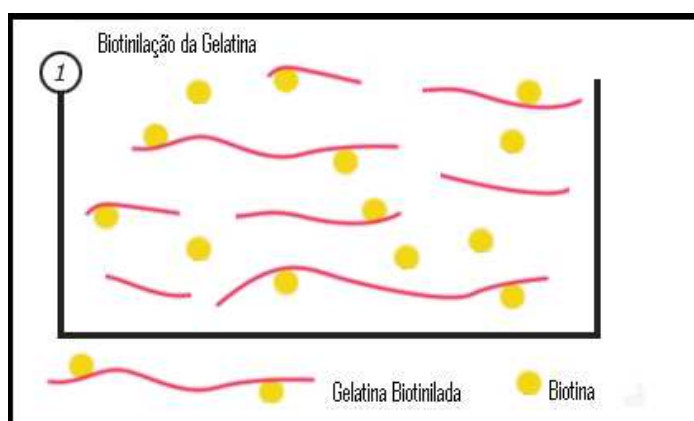


FIGURA 4 - Etapa de Biotinilação da Gelatina A biotina é incubada com a gelatina (10 mg/ml) a temperatura ambiente por 30 minutos, sob agitação.

3.3 ENSAIO BASEADO EM MICROPLACAS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMP UTILIZANDO GELATINA BIOTINILADA

Foi seguido o protocolo estabelecido por Ratnikov e colaboradores (2000), com algumas modificações. A gelatina biotinilada (GB) foi dissolvida em tampão de reação (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0,005% NP-40), na concentração final de 10 $\mu\text{g/ml}$, e incubada com as enzimas do sobrenadante de meio de cultivo de cada linhagem, de acordo com as condições especificadas em cada experimento (figura 5).

A placa com estreptavidina imobilizada (Nunc) foi pré-lavada 3 vezes com 300 μl /poço de PBS acrescido de 0,05 % Tween 20 e em seguida incubada com 100 μl /poço de GB digerida, por 1h a 37°C, para que a biotina presente nos produtos de digestão pudesse se ligar à estreptavidina imobilizada. Os fragmentos que não se ligaram foram eliminados através das etapas de lavagem (3 vezes de 3 minutos cada) com PBST e então a E-HRP em tampão de reação na diluição de 1:500 foi incubada por 1 hora a 37°C. Foi realizado mais um ciclo de lavagens e então colocados 100 μl /poço da solução de revelação: tampão citrato (50mM fosfato dissódico monoácido, 24mM ácido cítrico, pH 5 a 5,2), OPD (o-fenildiamina) (0,2 mg/mL em tampão citrato pH 5 a 5,2) e 0,06% peróxido de hidrogênio. Após 5 a 15 minutos de incubação no escuro, à temperatura ambiente, a revelação foi interrompida com 10 μL /poço de solução de H_2SO_4 2M, possibilitando a leitura da absorbância em leitor de microplacas com filtro de 490nm (figura 6).

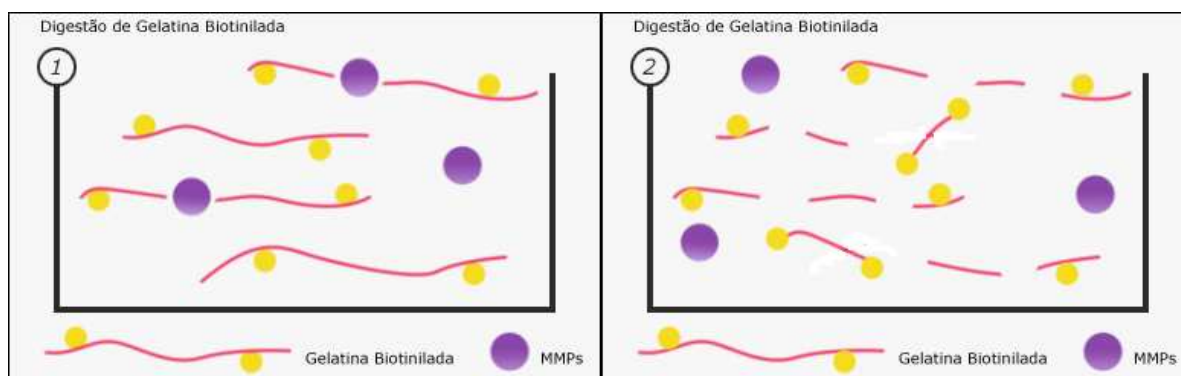


FIGURA 5 - Etapa de digestão da gelatina biotinilada por metaloproteases 1- Início da Digestão; A gelatina é clivada em fragmentos menores, os quais podem ou não conter biotina ligada covalentemente, em número variável, proporcional ao tamanho do fragmento. 2- Final da Digestão. Apenas os produtos de digestão com duas biotinas ligadas serão capazes de se ligar tanto à estreptavidina imobilizada na placa quanto à estreptavidina conjugada à enzima peroxidase. Fragmentos sem biotina serão eliminados nas etapas de lavagem e fragmentos com apenas uma biotina não contribuirão para a absorbância da reação colorimétrica.

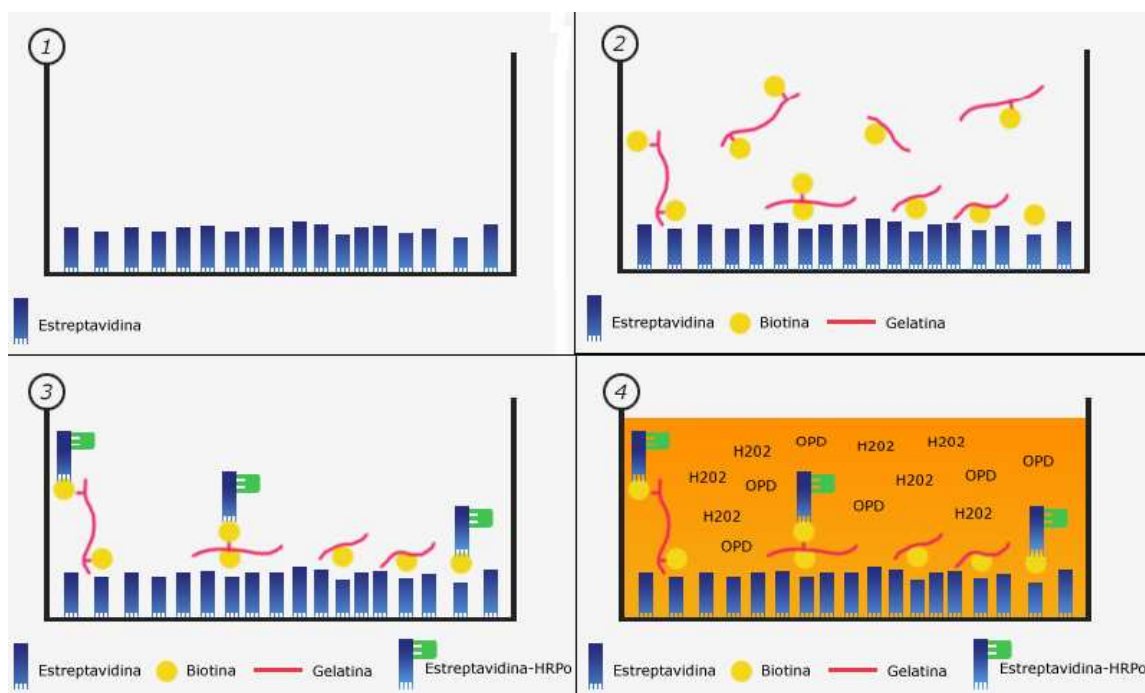


FIGURA 6 - Ensaio para determinação da atividade gelatinolítica de MMPs usando GB 1- A placa contendo estreptavidina imobilizada é pré-lavada 3 vezes de 1 min com PBST; 2- Os produtos da digestão são adicionados e deixados ligar por 1 hora a 37°C. Os fragmentos que não ligaram são eliminados através de lavagens com PBST; 3- A estreptavidina conjugada à enzima peroxidase (1:500) é incubada por 1 hora a 37°C; 4- A solução de revelação é adicionada e após 15 minutos a reação é bloqueada com H₂SO₄ 2M. A absorbância é lida no comprimento de 490nm.

3.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMPS POR ZIMOGRAFIA

As amostras de sobrenadante do meio de cultura em tampão de amostra não redutor foram submetidas a docedil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) em gel de poliacrilamida 10% copolimerizado com 2mg/ml de gelatina (Difco). O gel foi então lavado com 2,5% de Triton X-100 por 3 vezes de 15 minutos para remoção do SDS e renaturação da enzima e incubado por 24h em Tampão Ótimo (5 mM Tris, 200 mM NaCl, 4,5 mM CaCl₂), em estufa a 37°C, para digestão do substrato imobilizado. O gel foi corado com Coomassie Blue e a atividade gelatinolítica avaliada.

3.5 ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MMPS POR IMMUNOBLOTTING

O padrão de expressão de MMPs das linhagens estudadas foi analisado por *immunoblotting*, na tentativa de identificação de qual MMP estava presente na

amostra. O sobrenadante de meio de cultura de cada linhagem, após o processamento descrito no item 3.1, foi submetido a um SDS-PAGE 10%, eletrotransferido para membrana de nitrocelulose e corado com Ponceau-S para análise da eficiência da transferência. Após o bloqueio com 5% leite sem gordura (Molico, Nestlé) em solução de TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 120 mM NaCl e 0,05% Tween 20), a membrana foi incubada por 16 horas a 4° C com os anticorpos primários anti – MMP 2 (1:500, Santa Cruz) e anti-MMP 9 (1:500, Santa Cruz) diluídos em TBST- leite. A membrana foi então lavada cinco vezes com TBST, incubada por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase: anti - imunoglobulina de coelho (1:3000, Sigma) para anti –MMP 2 ou anti - imunoglobulina de cabra (1:1000, KPL) para anti – MMP-9.

A membrana foi lavada cinco vezes com TBST e a reação evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (West Pico, Pierce CO.) sobre a membrana, exposta a um filme para raios-X (Kodak).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via com teste *post hoc* de Turkey (GraphPad Prism software, San Diego, CA). Foram considerados significativos os resultados com $p < 0,05$. Os dados agrupados foram analisados por ANOVA de duas vias (Statistica versão 5.5, Statsoft Inc, Tulsa, USA, 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIOTINILAÇÃO DA GELATINA

Para determinação da melhor concentração a ser utilizada nos ensaios posteriores foi realizada uma diluição seriada da gelatina biotinilada diretamente na placa com estreptavidina imobilizada, seguida de incubação com E-HRP (gráfico 1).

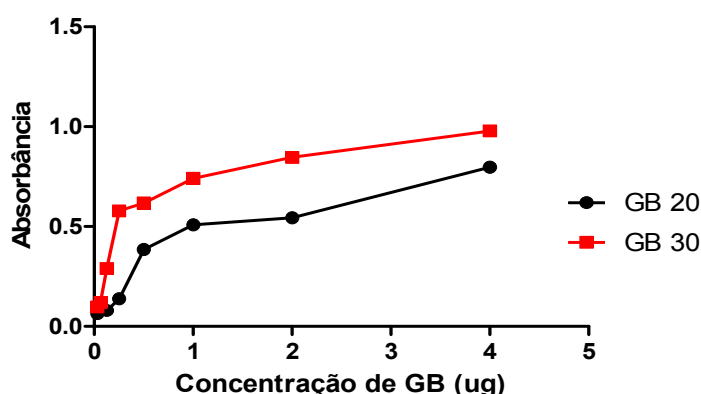


GRÁFICO 1 - Determinação da concentração ótima de gelatina biotinilada A linha em vermelho com pontos representados por quadrados corresponde à GB com 30x de excesso molar de biotina em relação à gelatina e a linha preta, com pontos representados por círculos, corresponde à GB com 20x de excesso molar.

Como esperado, foram observados valores de absorbância sempre mais altos para a GB com excesso molar de 30 em relação à GB 20, sendo que o limite de detecção para a primeira é de 0,125 µg, enquanto que para a última são necessários no mínimo 0,25 µg. Por este motivo, optou-se por trabalhar com a GB 30.

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE CONDICIONAMENTO DO SOBRENADANTE DE CULTURA

Inicialmente foi utilizada a linhagem celular tumoral HeLa, apenas para padronização das condições experimentais. Para determinar o tempo de condicionamento das células mais adequado, dois intervalos de tempo foram testados: um de 48 horas, para maximizar a quantidade de enzimas secretadas sem prejudicar a viabilidade celular (devido à ausência de soro fetal bovino), e outro de 2

horas, para diminuir o tempo necessário para a realização do ensaio, que segundo Das *et al.* (2008) seria suficiente para detectar atividade gelatinolítica de MMPs secretadas pela linhagem de câncer de mama MCF-7. Além disso, a diminuição do tempo de condicionamento permitiria analisar linhagens com taxas de divisão diferentes, como MEF WT e Mef KO. Neste caso, partindo-se do mesmo número de células, após 48 horas já é possível perceber uma diferença entre as cepas, pelo que a utilização de um intervalo de tempo menor é de crucial importância.

Após o condicionamento, o sobrenadante foi coletado, concentrado 20x e em seguida 200 µl foram incubados por 16 horas a 37°C com 1 µg de GB. Os produtos de digestão foram analisados através do ensaio baseado em microplacas (gráfico 2) descrito no item 3.3. Para o cálculo da porcentagem de digestão, a absorbância obtida para GB sozinha foi considerada como 100%.

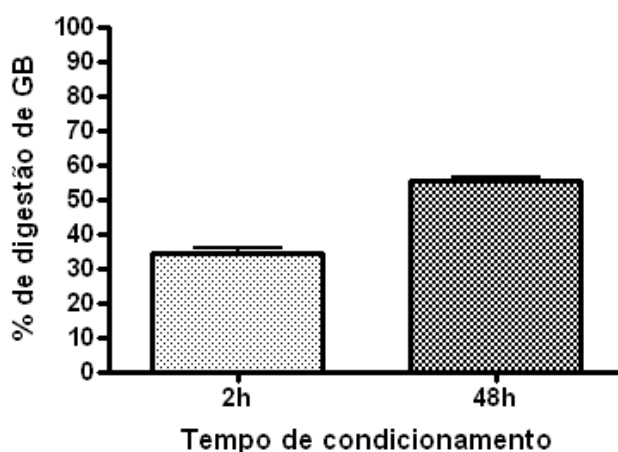


GRÁFICO 2 – Influência do tempo de condicionamento na atividade gelatinolítica de MMPs secretadas pela linhagem HeLa As barras representam os valores médios e as linhas verticais o desvio padrão da média.

Apesar da atividade gelatinolítica de MMPs secretadas ser detectável em apenas 2h, o que representa uma enorme economia de tempo, a quantidade de enzimas presente no sobrenadante condicionado é muito baixa, sendo necessário concentrar a amostra antes da incubação com a GB. Visto que inúmeras etapas de processamento da amostra aumentam a probabilidade de degradação ou perda de atividade da enzima, optamos por aumentar o tempo de condicionamento para 4 horas e eliminar a etapa de concentração, uma vez que estas se apresentaram como sendo as condições ideais para realização deste tipo de ensaio.

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DA ENZIMA COM O SUBSTRATO

Uma vez determinado o tempo de condicionamento do meio de cultura da célula, foi avaliada a influência do tempo de incubação da enzima com a gelatina biotinilada, em três das quatro diferentes linhagens: HeLa, T98G e N2a. Para isso, todas as células foram plaqueadas na mesma densidade (1×10^6) e condicionadas por 4 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e incubado a 37°C com 1 µg de GB por 1, 4 ou 16 horas. Uma amostra foi incubada por 16h na presença de 20 mM do inibidor de proteases ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que atua como um quelante de Ca^{2+} . Os produtos de digestão foram analisados através do ensaio baseado em microplacas descrito anteriormente (gráfico 3).

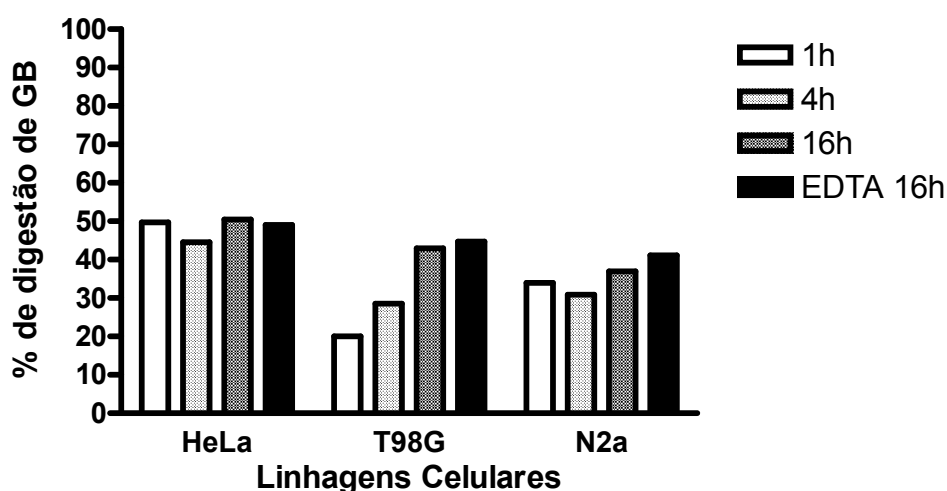


GRÁFICO 3 – Influência do tempo de incubação com GB em três linhagens celulares Para cada uma das três linhagens (HeLa, T98G e N2a) foram testados 3 intervalos de tempo (1h, 4h e 16h). Uma amostra adicional foi incubada por 16h na presença de EDTA (EDTA 16H). As barras representam os valores médios.

É possível perceber que apenas a linhagem T98G respondeu de forma tempo-dependente. As linhagens HeLa e N2a apresentaram, respectivamente, a maior e menor taxa de digestão. Além disso, o EDTA mostrou-se ineficiente na inibição de MMPs, em todas as linhagens. Através dos dados obtidos concluiu-se que o tempo de incubação não é uma variável crucial na determinação da taxa de digestão. Porém, apesar da escolha de 1 hora como tempo padrão de incubação otimizar a realização do ensaio, pode subestimar a taxa de digestão de GB. Por este

motivo, optamos por adotar a incubação por 16 horas, a 37°C, do sobrenadante com a GB.

Quanto à atividade gelatinolítica das amostras incubadas na presença de 20 mM de EDTA, podemos supor que este resultado seja um indicativo da presença, no sobrenadante de cultivo das linhagens estudadas, de proteases pertencentes a outras famílias, cujo mecanismo de ação não é dependente de íons divalentes e que portanto não estariam sujeitas a inibição quando na presença de um quelante com o EDTA.

4.4 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES DE PROTEASES

Uma vez padronizados o tempo de condicionamento e o tempo de incubação com o substrato, era necessário confirmar a identidade das enzimas responsáveis pela digestão observada. Sabendo das limitações do uso de EDTA como inibidor de metaloproteases de amplo espectro, nas condições experimentais deste ensaio, foi tentada uma nova abordagem. Para mostrar que a atividade gelatinolítica observada é devida à ação de MMPs, e não de outras proteases, uma amostra de sobrenadante de cada linhagem (T98G e N2a) foi fervida antes da incubação com GB. Outra amostra foi diretamente incubada com GB, por 16 horas, na presença de 1 mM do inibidor de serina-proteases Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF). Como esperado, a desnaturação protéica provocada pela fervura da amostra, mas não a presença de PMSF, diminuiu a taxa de digestão da GB, na linhagem T98G (dados não mostrados). Na linhagem N2a, a amostra incubada com PMSF apresentou uma pequena diminuição na taxa de digestão, no entanto esta não foi significativa (gráfico 4).

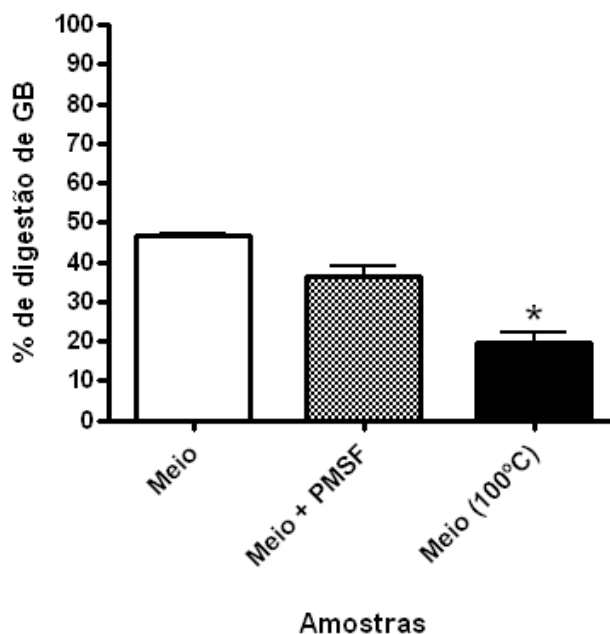


GRÁFICO 4 – Efeito do PMSF e desnaturação protéica causada por fervura na atividade gelatinolítica de MMPs em N2a A diminuição da taxa de digestão de GB pela amostra incubada com PMSF (Meio+PMSF) não é estatisticamente significativa ($p>0,05$), ao contrário da amostra fervida (Meio 100°C) ($p<0,01$).

Aparentemente, a digestão observada quando a GB é incubada com sobrenadante de meio de cultivo não é um artefato, visto que, se o mesmo é previamente fervido, a atividade proteolítica é comprometida. Contudo, ainda não é possível afirmar que esta atividade é efetivamente realizada por metaloproteases. Por este motivo, foi realizado um zimograma no qual foram aplicadas as mesmas amostras de sobrenadante condicionado de HeLa, T98G e N2a do experimento anterior, mas desta vez na presença ou ausência de 20 mM de 1, 10 fenantrolina (Fe), um inibidor geral de MMPs, que atua como quelante de íons metálicos (figura 7).

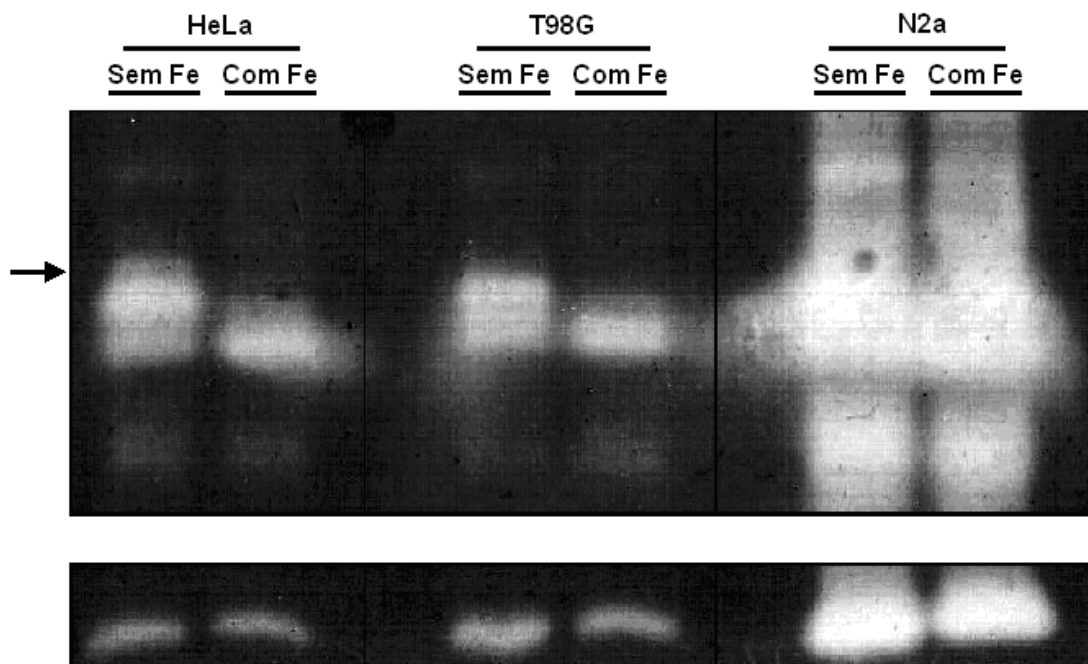


FIGURA 7 – Efeito da Fenantrolina sobre a atividade gelatinolítica de proteases secretadas por HeLa, T98G e N2a, detectada por zimografia Para cada linhagem foi utilizada uma amostra na ausência (sem Fe) ou presença (com Fe) de Fenantrolina. A seta mostra onde a atividade gelatinolítica é inibida, quando na presença de Fenantrolina.

A atividade gelatinolítica de proteases secretadas por N2a é visivelmente maior do que nas outras linhagens, o que pode ser explicado por uma concentração mais alta de enzimas, uma maior variedade das mesmas, ou uma combinação de ambos. É possível que esta característica seja o reflexo de um fenótipo mais agressivo desta linhagem, quando comparada a outras (LEVICAR *et al*, 2003).

Este resultado também sugere que apenas uma pequena fração da proteólise de gelatina observada é mediada por MMPs, sendo o restante devido à ação de outras proteases, de identidade ainda desconhecida. Talvez por este motivo a utilização de EDTA anteriormente não se tenha mostrado eficaz (gráfico 3), enquanto que o PMSF mostrou uma tendência a inibir a digestão da GB (gráfico 4). Portanto, podemos concluir que, além de ser alvo de degradação pelas MMPs 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 17 e 26, a gelatina provavelmente também pode ser um substrato para outras proteases.

4.5 DIGESTÃO DE GELATINA POR OUTRAS PROTEASES

Para testar a hipótese de que a capacidade de clivar colágeno desnaturado não é exclusividade da família de enzimas conhecidas como metaloproteases de

matriz, o ensaio para determinação de atividade gelatinolítica baseado em microplaca foi repetido, mas desta vez utilizando-se 20 µg de tripsina, uma serina-protease, na presença ou ausência dos inibidores de proteases PMSF (1 mM), 1,10 fenantrolina (10 Mm) , N-etil-maleimida (NEM, 1mM), um inibidor de cisteína-proteases, ou inibidor completo de proteases (InC) (Roche, USA).

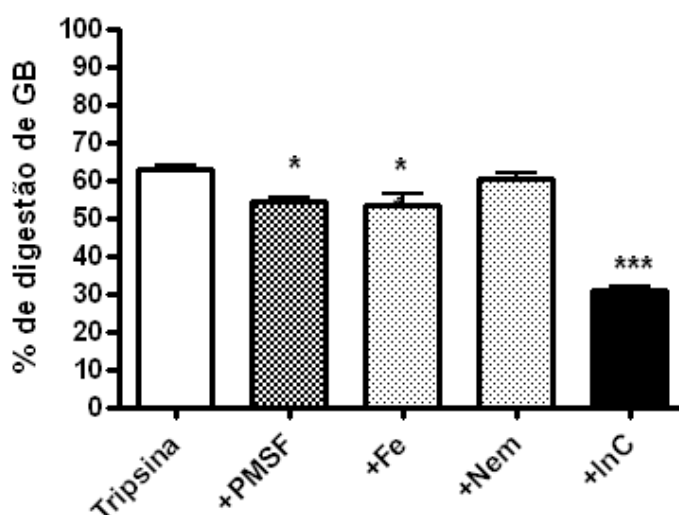


GRÁFICO 5 – Digestão de GB por tripsina, na presença ou ausência de inibidores de proteases

Observou-se uma diminuição significativa da digestão quando esta ocorreu na presença de PMSF, Fenantrolina (Fe) (* $p < 0,05$) e Inibidor Completo de Proteases (InC) (** $p < 0,001$), mas não na presença de N-etil-maleimida (NEM).

Podemos concluir que a gelatina é eficientemente digerida pela serina - protease tripsina, o que corrobora os experimentos anteriores. Como esperado, a sua atividade é significativamente diminuída pelo inibidor completo de proteases. É interessante notar que uma porcentagem considerável de digestão, cerca de 30%, continua ocorrendo, mesmo na presença do InC. Ainda assim, é muito mais eficaz do que a simples utilização de PMSF, que provoca apenas uma sutil inibição da atividade da enzima. Provavelmente isto se deve à instabilidade do mesmo quando em solução aquosa, em pH ~7, sendo degradado em aproximadamente 55 minutos, tempo após o qual a enzima está livre para executar sua função (BARRET, 1994). Curiosamente, a fenantrolina exerceu um pequeno, mas significativo efeito sobre a tripsina. Por este motivo, a sua utilização como inibidor específico de MMPs deve ser vista com cautela. Como previsto, o inibidor de cisteína-proteases NEM não alterou a atividade da tripsina.

Mediante estes resultados, temos razões para acreditar que existe uma mistura complexa de diferentes proteases com atividade gelatinolítica, secretadas em apenas 4h, no sobrenadante condicionado das linhagens de HeLa, T98G e N2a.

4.6 EFEITO DA LAMOTRIGINA NA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMPS

As linhagens T98G e N2a foram condicionadas na presença da droga lamotrigina, em três doses: 10, 50 ou 100 μM . Como controle, foi adicionado o veículo da droga. Após o tratamento, o sobrenadante foi coletado e incubado com GB na presença ou ausência dos inibidores de proteases 1,10 fenantrolina ou inibidor completo de proteases. Em ambas as linhagens, N2a (gráfico 6) e T98G (dados não mostrados), foram obtidos os mesmos resultados: a atividade gelatinolítica permanece inalterada na presença das diferentes doses de lamotrigina ($p>0,05$), mas é significativamente diminuída na presença de fenantrolina ($p<0,05$).

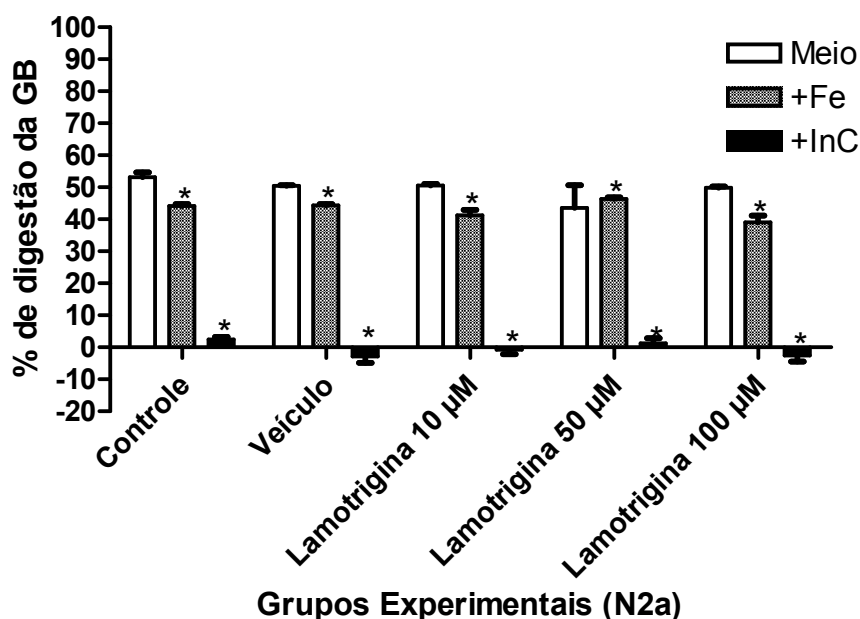


GRÁFICO 6 – Efeito da Lamotrigina da atividade gelatinolítica de MMPs secretadas por N2a. As amostras com fenantrolina ou inibidor completo foram significativamente inibidas ($*p<0,05$), em todos os grupos experimentais (Controle, Veículo, Lamotrigina 10, 50 e 100 μM).

Como esperado, o inibidor completo foi capaz de bloquear completamente a digestão. Contudo, é importante ressaltar que a inibição por fenantrolina é um processo reversível, o que pode explicar, em parte, a sua relativamente baixa

eficácia como inibidor de MMPs. Estes dados corroboram os experimentos anteriores, pois sugerem que, possivelmente, a degradação observada é mediada em grande parte por outras proteases e, talvez por este motivo, a droga não surtiu um efeito tão pronunciado quanto o inibidor completo.

4.7 EFEITO DA PROTEÍNA PRÍON CELULAR NA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMPs

As linhagens MEF selvagens e nocaute para PrPc foram condicionadas e seu sobrenadante coletado e incubado com GB, com ou sem os inibidores de proteases PMSF, Fe e InC. Foi observada uma diferença significativa entre as linhagens, nas amostras com apenas meio de cultivo, ou seja, sem inibidores (gráfico 7).

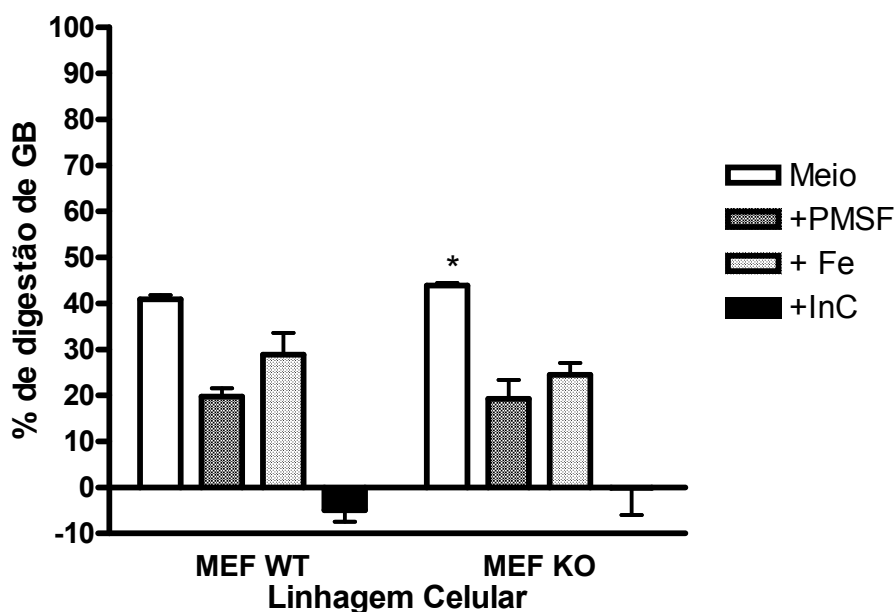


GRÁFICO 7 – Efeito da presença de PrPc sobre a atividade gelatinolítica de MMPs secretadas por MEF selvagens (WT) e nocaute (KO) Na linhagem KO registrou-se um aumento significativo na taxa de digestão (* $p < 0,01$). Não foram identificadas diferenças significativas entre a taxa de digestão de GB das linhagens WT e KO nas amostras incubadas com PMSF, Fe e InC ($p > 0,05$).

A atividade enzimática foi completamente bloqueada pelo inibidor completo e apenas parcialmente pelos inibidores PMSF e fenantrolina. Este resultado sugere que, aparentemente, pode existir no sobrenadante do meio de cultivo da linhagem MEF uma mistura de proteases, provavelmente pertencentes a mais de uma família de proteases (serina e metaloproteases). Além disso, podemos também perceber

que na ausência de PrPc houve um aumento na atividade gelatinolítica ($p < 0,05$). Porém, mais estudos necessitam ser realizados até que a natureza desta relação seja esclarecida, ou seja, a forma como acontece e a função que cumpre.

4.8 ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MMPS POR IMMUNOBLOTTING

O padrão de expressão das MMPs 2 e 9 (gelatinases) secretadas pelas linhagens HeLa, T98G, N2a, MEF WT e MEF KO foi analisado por *immunoblotting*. O sobrenadante foi condicionado por 4 horas, concentrado e submetido ao procedimento descrito em 3.5. Em nenhuma amostra foi observado o aparecimento de uma banda na altura esperada de 72 kDa para MMP2 e 92 kDa para MMP 9 (dados não mostrados). A falta de uma amostra de MMP2 e 9 purificadas, que pudesse servir como controle positivo, deixa em aberto as razões por detrás do resultado negativo, que pode ser devido tanto à baixa concentração das proteínas em questão (abaixo do limite de detecção da técnica), quanto à viabilidade/qualidade dos anticorpos utilizados. Na tentativa de contornar a falta de ferramentas eficientes para a análise do padrão de expressão de MMPs, foi hipotetizado que a sua presença poderia ser detectada indiretamente, por *immunoblotting* dos fragmentos de gelatina biotinilada digerida. Para isso, uma amostra de meio de cultivo condicionado das linhagens HeLa, T98G e N2a incubado com GB foi submetida a SDS-PAGE, eletrotransferida para membrana de nitrocelulose e reagida com estreptavidina conjugada com a enzima peroxidase (1:1000, Sigma). Porém, a reação ficou tão forte, devido à grande quantidade de biotina presente, que era impossível distinguir as bandas correspondentes aos fragmentos digeridos (dados não mostrados). O mesmo experimento foi repetido, aumentando a diluição da E-HRP para 1:3000. Ainda assim, o mesmo resultado foi obtido para o controle positivo (apenas GB). Porém, as amostras de GB digerida tornaram-se indetectáveis (dados não mostrados).

Portanto, os dados de atividade enzimática de MMPs não puderam ser complementados com dados referentes à sua expressão, nas diferentes linhagens.

4.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comunicação cruzada que acontece entre as células e o microambiente que as envolve está apenas começando a ser entendida. Neste cenário, a matriz extracelular é o palco de uma complexa rede de interações em que as metaloproteases desempenham um papel fundamental. Hoje sabe-se que eventos de clivagem mediada por MMPs estão associados tanto com estimulação quanto repressão da proliferação celular, aumento e diminuição de quimiotaxia e migração, estímulos anti e pro-apoptóticos, intensificação e atenuação da resposta imune. A compreensão dos mecanismos que regulam a biologia da matriz extracelular poderá fornecer valiosas pistas para a elucidação de inúmeros processos fisiológicos e patológicos, assim como para o desenho e aplicação terapêutica de inibidores de MMPs na prevenção e tratamento de várias doenças, como câncer (YONG *et al.*, 1998; McCAWLEY e MATRISIAN, 2001; VU, 2001; STERNLICHT e WERB, 2001; LEVICAR *et al.*, 2003; MOTT e WERB, 2004).

O desenvolvimento de novas ferramentas e o aperfeiçoamento das técnicas já existentes é de crucial importância para o avanço das pesquisas nesta área. Neste sentido, o presente trabalho objetivou a padronização de um método para determinação da atividade enzimática de MMPs, utilizando um substrato comum a praticamente todos os membros desta família, o colágeno tipo I desnaturado, também conhecido como gelatina. Criado por Ratnikov e colaboradores (2000), o princípio deste método consiste na capacidade da estreptavidina capturar a biotina ligada aos fragmentos de gelatina digeridos por MMPs. Por ser rápido e simples, é ideal para triagem de bibliotecas químicas de inibidores sintéticos, por exemplo. Igualmente importante é a sua aplicação em estudos que procurem determinar fatores envolvidos na secreção e regulação da atividade de MMPs.

A presença de MMPs no cérebro não passou despercebida e sua contribuição para processos como memória, aprendizado, migração e plasticidade neuronal têm sido extensivamente documentada (OH *et al.*, 1999, SZKLARCZYK *et al.*, 2002, MEIGHAN *et al.*, 2006, WRIGHT *et al.*, 2003, WRIGHT *et al.*, 2007, CHAILLAN *et al.*, 2006, NAGY *et al.*, 2007). Isto levou-nos a investigar uma possível relação entre os receptores glutamatérgicos NMDA ou a proteína príon celular com a atividade

proteolítica mediada por metaloproteases. Os resultados obtidos em todas as linhagens celulares analisadas levaram-nos a acreditar que grande parte da atividade gelatinolítica observada é, possivelmente, mediada por outras proteases, de identidade desconhecida. No entanto, apesar de inesperados, estes resultados estão longe de serem inéditos. Song e Windsor (2005) relataram degradação de colágeno não mediada por metaloproteases. Utilizando fibroblastos sinoviais da junção temporomandibular na passagem 3 a 8, detectaram digestão de colágeno, que podia ser completamente inibida por GM6001, um inibidor sintético de MMPs. Porém, quando utilizaram fibroblastos na passagem 8 a 13, a clivagem de colágeno foi dramaticamente inibida pelo inibidor de serina proteases (SPI), mas não por 1,10 fenantrolina, um inibidor de metaloproteases. Os autores sugerem que alterações do ambiente celular podem ter desencadeado a expressão de novos genes, induzido novas proteínas e modificado as interações célula-célula e célula-matriz, levando as células a utilizarem uma via de degradação de colágeno independente de MMPs. O significado biológico ou vantagem adaptativa desta resposta permanece obscuro. Em outro trabalho foi detectada a presença de uma collagenase de alta massa molecular em tecido de carcinoma humano, com características “híbridas” que inviabilizaram a sua identificação *a priori* (TSUDA *et al.*, 1993). De forma semelhante a uma MMP, esta enzima é capaz de digerir colágeno tipo IV e gelatina, é inibida por EDTA e 1,10 fenantrolina e é ativada por tripsina. No entanto, não é inibida por TIMPs nem ativada por APMA e a sua massa molecular não se assemelha ao de nenhuma outra metaloprotease conhecida. Sawada e colaboradores (2000) isolaram e caracterizaram uma serina-protease semelhante a tripsina capaz de degradar laminina e colágeno tipo IV. A enzima, proveniente de cérebro de rato, foi detectada por zimografia de gelatina e identificada como sendo a P22, uma proteína secretada de 22 kDa, inibida por aproptinina e benzamidina (inibidores de serina-proteases), mas não por fenantrolina.

Recentemente, grande atenção tem sido dada ao papel de várias serina-proteases extracelulares presentes no cérebro em processos como neurodegeneração e neuroregeneração, plasticidade e desenvolvimento neural. De particular interesse é a serina-protease neuropsina, capaz de degradar componentes da matriz extracelular e envolvida, por exemplo, em crescimento de neuritos, sinaptogênese, regulação da plasticidade hipocampal, potenciação de longo termo e epilepsia (WANG *et al.*, 2008). Não é possível descartar a possibilidade de que esta

ou qualquer uma das outras proteases acima citadas seja, pelo menos em parte, responsável pela atividade gelatinolítica aqui documentada. Isso reforça a necessidade de mais estudos, até que a identificação e caracterização das enzimas detectadas neste trabalho estejam completas. Para tanto, são necessários anticorpos e inibidores específicos para cada família de proteases e em particular para alguns de seus membros, como as MMP 2, 3 e 9, e até para neuropsina. Outra alternativa seria a identificação das proteínas presentes nos sobrenadantes do meio de cultivo das linhagens aqui analisadas por espectrometria de massa. Quando em posse destas ferramentas, talvez seja possível propor hipóteses mais consistentes que expliquem, por exemplo, os resultados aqui obtidos, uma vez que até ao momento só podemos perambular no plano da especulação, mesmo porque, provavelmente, muitos dos conceitos atuais sobre proteases necessitam de revisão. Podemos supor que, sendo PrPc uma molécula envolvida na adesão celular (MANGÈ *et al.*, 2002), a sua ausência levaria a eventos relacionados à migração e motilidade celulares, o que resultaria em um aumento na atividade de MMPs. Experimentos futuros poderão ser direcionados para testar esta hipótese, utilizando as duas linhagens em ensaios de adesão sobre moléculas de matriz e ensaios de migração em câmara de Boyden.

Estes resultados demonstram que ainda existe uma grande lacuna de conhecimentos a ser preenchida nesta área até que os mistérios que se escondem por detrás do funcionamento do cérebro nos sejam revelados.

5. CONCLUSÃO

Através do presente trabalho podemos concluir que as linhagens celulares de adenocarcinoma humano (HeLa), glioblastoma multiforme humano (T98G), neuroblastoma murino (N2a) e fibroblasto murino (MEF) selvagem e nocaute para PrPc provavelmente secretam uma mistura complexa de várias proteases capazes de digerir colágeno tipo I desnaturado. Além disso, verificamos que, nas condições e métodos aqui utilizados, essa atividade proteolítica é aumentada na ausência da proteína príon celular na superfície da célula, mas não é alterada pela presença da droga antiglutamatérgica lamotrigina no meio de cultivo. No entanto, mais estudos são necessários para o isolamento e caracterização das enzimas aqui detectadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRET, A. J. Classification of Peptidases **Methods in Enzymology** v. 244 p.1-15, 1994

CAROBREZ, A.P.; Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade **Revista Brasileira de Psiquiatria** v.25 p.52-58, 2003

CHAILLAN F.A. *et al*; Involvement of tissue inhibition of metalloproteinases-1 in learning and memory in mice **Behavioural Brain Research** v.173 p. 191-198, 2006

DAS S. *et al*.; Rapid expression and activation of MMP-2 e MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium **Life Sciences** v.82 p.467-476, 2008

DI DANIEL E, MUDGE AW, MAYCOX PR.; Comparative analysis of the effects of four mood stabilizers in SH-SY5Y cells and in primary neurons **Bipolar Disorders** v.7 p.33–41, 2005

DU, J. *et al*.; Enhancing AMPA to NMDA throughput as a convergent mechanism for antidepressant action **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies** v.3 n.4 p.519-526, 2006

DUMAN R. S.; Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity **Eur Psychiatry** v.17 suppl 3 p. 306-310, 2002

DZWONEK J.; RYLSKI M.; KACMAREK L. Matriz metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain **Febs Letters** v.567 p. 129-135, 2004

GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S. M.; MARTINS, V. R.; JAY, D.G.; BRENTANI, R.R.; Cellular prion protein binds laminina and mediates neuritogenesis **Molecular Brain Research** v.76 p. 85-92, 2000

HAJJ, G. M., *et al*.; Integrins compensate PrPc interaction with vitronectin to support axonal growth. **Journal of Cell Science** v. 120, p. 1915-1926, 2007

HERMANSON G.T.; Bioconjugate Techniques **Academic Press**, 1996

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M.; Essentials of Neural Science and Behavior **Appleton & Lange**, United States of America, 2000

KEMP, J.A.; MCKERNAN, R.M.; NMDA receptor pathways as drug targets **Nature Neuroscience**, v.5 p. 1039-1042, 2002

KETTER T.A. MANJI H. K.; POST R. M.; Potencial Mechanisms of action of lamotrigine in the treatment of bipolar disorders **J Clin Psychopharmacology** v. 23 p. 485-495, 2003

LETOURNEAU P. C., CONDIC M. L., SNOW D. M.; Interactions of developing neurons with the extracellular matrix **The Journal of Neuroscience** v. 14(3) p. 915-928, 1994

LEVICAR N.; NUTALL R. K.; LAH T.T.; Proteases in brain tumor progression **Acta Neurochirurgica** v. 145 p.825-838, 2003

LOPES, M. H. *et al.*; Interaction of Cellular Prion and Stress-Inducible Protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways **The Journal of Neuroscience** v.25 (49), p. 11330-11339, 2005

MACKOWIAK, M. *et al.*; Neurogenesis in the adult brain **Polish Journal of Pharmacology** v.56 p.673-687, 2005

MANGÉ A.; MILHAVET O.; UMLAUF D.; HARRIS D.; LEHMANN S.; PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells **FEBS Letters** v. 514, p.159-162, 2002

MASSOVA I. *et al.*; MMPs: Structures, Evolution and Diversification **The Faseb Journal** v.12 p. 1075-1095, 1998

MATRISIAN L. M.; The matrix-degrading metalloproteinases **BioEssays** v.14 n.7 p. 455-463, 1992

McCAWLEY L. J.; MATRISIAN L.M.; Matrix Metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Current Opinion in Cell Biology** v.13 p.534-540, 2001

MEIGHAN S. E. *et al.*; Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity **Jr of Neurochemistry** v.96 p. 1227-1241, 2006

MOTT J.D.; WERB Z.; Regulation of Matrix Biology by Matrix Metalloproteinases **Current Opinion in Cell Biology** v.16 p.558-564, 2004

MURPHY G.; CRABBE T.; Gelatinases A and B **Methods Enzymology** v.248 p. 470-495, 1995

NAGASE H.; VISSE R.; MURPHY G.; Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs **Cardiovascular Research** v.69: p. 562-573, 2006

NAGY V.; BOZDAGI O.; HUNTLEY G.W.; The extracellular protease matrix metalloproteinase-9 is activated by inhibitory avoidance learning and required for long-term memory **Learning and Memory** v.14 p. 655-664, 2007

OH L.Y.S. et al.; Matrix Metalloproteinase-9/Gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes **The Journal of Neuroscience** v. 19(9) p. 8464-8475, 1999

PAUL I. A.; SKOLNICK P.; Glutamate and depression **Ann.N.Y.AcadSci**, v. 1003 p. 250-273, 2003

PRUSINER S.B.; Prions **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 95 p. 13363-13383, 1997

RATNIKOV B. *et al.*; Determination of Matrix Metalloproteinase Activity Using Biotinylated Gelatin **Analytical Biochemistry** v. 286 p.149-155, 2000

SAWADA K. *et al.*; Purification and characterization of a trypsin-like serine-protease isolated from rat brain slices that degrades laminin and collagen type IV and stimulates protease-activated receptor-2 **Journal of Neurochemistry** v.74 p.1731-1738, 2000

SZKLARCZYK A.; Matrix Metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus **The Journal of Neuroscience** v. 22(3) p. 920-930, 2002

SONG F.; WINDSOR L.J.; Novel nonmatrix-metalloproteinase-mediated collagen degradation **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1721 p.65-72, 2005

SPORN J.; SACHS G.; The anticonvulsant lamotrigine in treatment-resistant manic depressive illness **Journal of Clinical Psychopharmacology** v.17 p. 185-189, 1997

STERNLICHT M. D.; WERB Z.; How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behaviour **Annu. Rev. Cel. Dev. Biol.** v.17 p. 463-516, 2001

TSUDA T.T. *et al.*; Isolation and characterization of a high molecular weight type IV collagenase isolated from human carcinoma tissue **Febs** v.319 p.35-39, 1993

VISSE R.; NAGASE H.; Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function and Biochemistry **Cardiovascular Research** p. 827-839, 2003

VU T. H.; Don't mess with the Matrix **Nature** v.28 p.202-203, 2001

WANG Y.; LUO W.; REISER G.; Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions **Cellular and Molecular Life Sciences** v.65 p.237-252, 2008

YONG W. V. *et al.*; Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS **Trends Neuroscience** v. 21 n.2 p. 75-80, 1998

WOESSNER J.F.; NAGASE H.; Matrix Metalloproteinases and TIMPs **Oxford University Press**, 2000

WRIGHT J.W. *et al.*; Ethanol-induced impairment of spatial memory and brain matrix metalloproteinases **Brain Research** v. 963 p. 252-261, 2003

WRIGHT J.W.; BROWN T.E. HARDING J.W. Inhibition of hippocampal matrix metalloproteinase-3 and -9 disrupts spatial memory **Neural Plasticity** p.1-8, 2007

ZANATA S.M., *et al.*; Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection **EMBO Journal** v.21, p. 3317-3326, 2002